Gdański Uniwersytet Medyczny

Algorytm oceny poziomu aloprzeciwciał anty-HLA specyficznych dla dawcy w surowicy biorców przeszczepu nerki

Hanna Zielińska

ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

Gdańsk 2014

Pracę wykonano w Katedrze Immunologii, Zakładzie Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierownictwem:

- Prof. dr hab. med. Piotra Trzonkowskiego – Promotora pracy
- Dr n. med. Grażyny Moszkowskiej – Promotora pomocniczego

Badania uzyskały finansowane z grantu promotorskiego nr rej N N402 562440 oraz z funduszy Ministerstwa Zdrowia, Programu Wieloletniego na lata 2011-2020 „Narodowy Program Rozwoju Medycyny Transplantacyjnej" w zakresie zadania dotyczącego wdrażania nowych programów przeszczepiania w grupach biorców o podwyższonym ryzyku w celu poprawy wyników leczenia transplantacyjnego.

Pracę dedykuję Maciejowi i Agacie

SPIS TREŚCI

SKRÓTY 6
WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY 7
1. WPROWADZENIE 8
1.1. Różnice w liczebności pacjentów zimmunizowanych 8
1.2. Ocena ryzyka immunologicznego w Polsce 9
1.3. Inne metody oceny stopnia immunizacji potencjalnych biorców 12
1.4. Programy dla zimmunizowanych biorców 14
2. CELE PRACY 15
3. NAJWAŻNIEJSZE SPOSTRZEŻENIA Z PREZENTOWANYCH DONIESIEŃ 16
3.1. Różnice w liczebności biorców podwyższonego ryzyka immunologicznego. ... 16
3.2. Zasada wykluczania retransplantowanych biorców z powtórzoną niezgodnością HLA wobec potencjalnego dawcy 20
3.3. Dodatkowe, nieimmunogenne niezgodności HLA u zimmunizowanych biorców oznaczone przy użyciu oprogramowania HLAMatchmaker® 21
3.4. Zmodyfikowana wersja cytometrycznej próby krzyżowej z oceną litycznośći przeciwciał wiązanych przez komórki dawcy 25
3.5. Propozycja algorytmu oceny immunologicznej biorców oczekujących na przeszczepienie nerki 28
4. WYKAZ CYTOWANEGO PIŚMIENNICTWA 32
5. STRESZCZENIA PRAC /ABSTRACTS 34

W ZAŁĄCZENIU PRACE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY

SKRÓTY

AMR – *Antibody Mediated Rejection* / odrzucanie przeszczepu zależne od przeciwciał

CDC - *Complement-Dependent* Cytotoxicity / test mikrolimfocytotoksyczności zależnej od dopełniacza

CDC-XM - *Complement Dependent Cytotoxicity Cross Match /* próba krzyżowa metodą mikrolimfocytotoksyczności zależnej od dopełniacza

CM /XM - Cross Match / próba krzyżowa

DSA - *Donor Specific Antibodies /* przeciwciała specyficzne wobec dawcy

FCXM - *Flow Cytometry Cross Match /* próba krzyżowa metodą cytometrii przepływowej

cFCXM - *Cytolitic Flow Cytometry Cross Match /* próba krzyżowa metodą cytometrii przepływowej z oceną cytolityczności przeciwciał

HLA - *Human Leukocyte Antigen /* antygeny zgodności tkankowej

HLA-MM - *Human Leukocyte Antigen – Mismatch /* powtórzona niezgodność HLA

IF /TA (wcześniej CAN) - *Interstitial Fibrosis (IF) and Tubular Atrophy (TA) (before Chronic Allograft Nephropathy)/* włóknienie śródmiąższowe i zanik cewek (wcześniej przewlekła niewydolność nerek)

KLO - Krajowa Lista Oczekujących / *Transplant Waiting List*

LS - *Luminex Screen /* test przesiewowy metodą Luminex

LSA - *Luminex Single Antigen /* oznaczenia swoistości przeciwciał anty-HLA z użyciem aparatu Luminex

MFI - *Mean Fluorescent Intensity* / średnia wartość fluorescencji

mmEp HLA - *Mismatch Eplets /* niezgodne, immunogenne fragmenty cząsteczki

PRA - *Panel Reactive Antibodies /* wynik badania stopnia uczulenia z panelem limfocytów potencjalnych dawców

cPRA - *calculated PRA /* kalkulowany PRA

vPRA - *virtual PRA /* wirtualny PRA

PRA-CDC - *Panel Reactive Antibodies-Complement Dependent Cytotoxicity /* stopień uczulenia biorcy z panelem limfocytów potencjalnych dawców metodą mikrolimfocytotoksyczności zależnej od dopełniacza

WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY

1. **Hanna Zielińska**, Maciej Zieliński, Grażyna Moszkowska, Alicja Dębska-Ślizień, Magdalena Jankowska, Bolesław Rutkowski, Piotr Trzonkowski.: **Diagnostic value of specific anty-HLA alloantibodies before and after renal transplantation. Programs for highly sensitized.** Postepy Hig. Med. Dosw. 2009; 63, 435-44

   Punktacja ministerstwa: 9.000 /IC™ Value: 5.72

2. **Hanna Zielińska**, Grażyna Moszkowska, Alicja Dębska-Ślizień, Maciej Zieliński, Magdalena Jankowska, Bolesław Rutkowski, Piotr Trzonkowski. **Możliwości diagnostyczne oceny ryzyka immunologicznego biorcy nerki przed przeszczepieniem i po jego wykonaniu**. Forum Nefrologiczne 2011, tom 4, nr 4, 320–330

   Punktacja ministerstwa: **4.000**

3. **Hanna Zielińska**, Grażyna Moszkowska, Maciej Zieliński, Alicja Dębska-Ślizień, Bolesław Rutkowski, Piotr Trzonkowski. **Algorithm to Manage Highly Sensitized Kidney Transplant Recipients in Poland.** Transplant. Proc. 2011, 43, 8, 2903-2907

   Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik IF: **1.005**
   Punktacja ministerstwa: **15.000**

4. **Hanna Zielińska**, Magdalena Jankowska, Maciej Zieliński, Grażyna Moszkowska, Alicja Dębska-Ślizień, , Bolesław Rutkowski, Piotr Trzonkowski. **Zależne od przeciwciał odrzucanie aloprzeszczepu nerkowego - opis przypadku.** Forum Nefrologiczne 2011, 4, 4, 347–355

   Punktacja ministerstwa: **4.000**

5. Maciej Zieliński, **Hanna Zielińska**, Grażyna Moszkowska, Alicja Dębska-Ślizień, Bolesław Rutkowski, Piotr Trzonkowski. **Modified flow cytometry crossmatch detecting alloantibody-related cytotoxicity as a way to distinguish lytic antibodies from harmless in allosensitised kidney recipients.** Transplant. Proc. 2013, 45,1, 88-94.

   Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik IF: **0.952**
   Punktacja ministerstwa: **15.000**

6. Grażyna Moszkowska, **Hanna Zielińska**, Maciej Zieliński, Anna Dukat-Mazurek, Alicja Dębska-Ślizień, Bolesław Rutkowski, Dorota Lewandowska. Roman Danielewicz, Piotr Trzonkowski: **Identification of patients with increased immunological risk among potential kidney recipients in the Polish population**. Hum. Immunol. 2014, 75, 7, 650-655.

   Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik IF: **2,298**
   Punktacja ministerstwa: **20.000**

Łączny IF prezentowanych prac: 4,255

1. WPROWADZENIE

Wśród przyczyn wpływających na długość przeżycia przeszczepu nerki podstawowe znaczenie mają czynniki immunologiczne: dobór w zakresie HLA oraz wcześniejsze uczulenie na te antygeny biorcy. Obecność swoistych aloprzeciwciał anty-HLA to zasadniczy wykładnik tego uczulenia, który u zimmunizowanych oczekujących na przeszczep jest główną barierą i przyczyną niepowodzenia zabiegu przeszczepienia. Szanse na przeszczep dla wysoko zimmunizowanego chorego są znacznie mniejsze, w porównaniu do pacjentów, u którego nie obserwuje się aloprzeciwciał. Efektem jest dłuższy okres oczekiwania na przeszczep i znacząco wyższe koszty leczenia (wydłużony czas dializ, leczenie powikłań, krótszy czas przeżycia przeszczepu). Przeszczepienie nerki u biorcy zimmunizowanego obarczone jest wyższym ryzykiem odrzucania zależnego od przeciwciał (AMR – Antibody Mediatel Rejection), a nawet przy braku AMR, przeżycie przeszczepu w tej grupie, jest znacząco gorsze. Wcześniej sądzono, że odrzucanie przewlekłe związane jest przede wszystkim z toksycznym uszkodzeniem narządu w wyniku stosowanych leków immunosupresyjnych. Ostatnie wieloośrodkowe badania wskazują, że główną przyczyną odrzucania przewlekłego jest właśnie reakcja humoralna. Nawet niskie poziomy przeciwciał specyficznych wobec dawcy są wykładnikiem obecności komórek pamięci, których klonalna proliferacja może w krótkim czasie doprowadzić do uszkodzenia przeszczepu. Stąd potrzeba stosowania coraz czulszych metod umożliwiających precyzyjny dobór narządu w oparciu o identyfikację szkodliwych przeciwciał. Właściwa identyfikacja biorców podwyższonego ryzyka immunologicznego daje przede wszystkim możliwość odpowiedniego przygotowania biorcy do przeszczepu (usunięcie przeciwciał przed przeszczepem, zastosowanie indukcji, odpowiedni protokół immunosupresji). Stanowi także konieczny punkt wyjścia dla monitorowania specyficznych wobec dawcy przeciwciał anty-HLA po przeszczepie (DSA – *donor specific antibodies*).

1.1. Różnice w liczebności pacjentów zimmunizowanych

Problem aloimmunizacji dotyczy znacznej liczby biorców, ponieważ antygeny układu HLA należą do jednych z najsilniej uczulających. W zależności od metody oceny przeciwciał, zimmunizowani stanowią 10 do ponad 40% zgłoszonych do przeszczepu. Ogromne rozbieżności w liczebności pacjentów zimmunizowanych w Polsce i na świecie wynikają z różnic w czułości metod oceny aloprzeciwciał. W Polsce osób o podwyższonym ryzyku immunologicznym (Panel Reactive Antibodies: PRA > 50%) jest 10% (130 spośród 1296 oczekujących w 2012 r.). Biorców wysokozimmunizowanych (PRA >80%) było 43, co stanowi 3,3% wszystkich oczekujących. Wartości te

utrzymują się w ciągu ostatnich lat na względnie stałym poziomie. Średni czas oczekiwania liczony od zakwalifikowania do przeszczepienia waha się pomiędzy 9 a 15 miesiącami. Brak jest danych dotyczących wyników przeszczepiania: częstości ostrego odrzucania oraz przeżycia przeszczepu w tej grupie. W USA, według rejestru UNOS (United Sharing of Organ Transplantation) liczącego prawie 96700 pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek, biorców wysokozimmunizowanych jest 15,8% (vs. 3,3% w Polsce) a zimmunizowanych aż 66%. Czas przeżycia przeszczepu biorców wysoko zimmunizowanych jest znacząco krótszy: po 5 latach od przeszczepu funkcjonuje ponad 10% mniej przeszczepów u wysokozimmunizowanych w porównaniu do pozostałych biorców. Roczne przeżycie przeszczepu u wysokozimmunizowanych różni się względem grupy nieobarczonej ryzykiem o 3,3%. Przed wprowadzeniem specjalnych programów dla wysokozimmunizowanych dostęp do przeszczepu takich biorców był też znacznie mniejszy – pomimo, że stanowili około 1/3 listy oczekujących, corocznie otrzymywali tylko 15% przeszczepionych nerek od zmarłych dawców. Zimmunizowani wysoko (PRA>80%) otrzymywali mniej niż 5% przeszczepów. W krajach zrzeszonych w Eurotransplancie (ET) w 2012r oczekuje na przeszczep 10151 biorców, z czego 8500 biorców jest PRA 0-5%, 1346 ma wynik PRA 6-84% a 232 jest wysokozimmunizowanych PRA 85-100%. W Wielkiej Brytanii zimmunizowani (PRA>10%) stanowią 41% listy oczekujących, w tym spośród zgłoszonych do retransplantacji aż 52% jest zimmunizowanych wysoko (cPRA>85%).

1.2. Ocena ryzyka immunologicznego w Polsce

Dzięki zmianie systemu alokacji w Polsce przeprowadzonej pod koniec 2009 roku, istotnie zwiększył się dostęp do transplantacji dla zimmunizowanych powyżej 50% PRA biorców (z 15,7% w 2009r do 30,5% w 2010r). Jednak brak identyfikacji przeciwciał uniemożliwia ocenę skali ryzyka transplantacji dla wysokozimmunizowanego biorcy. W obecnej praktyce stopień uczulenia (PRA) wyraża wynik testu mikrolimfocytotoksycznego **PRA-CDC** przeprowadzanego metodą serologiczną w teście cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC: Complement Dependent Cytotoxicity). Metoda CDC została opisana w 1969 roku przez Patel R., Terasaki P.I. i wsp. i funkcjonuje w formie praktycznie niezmienionej do dziś. Test polega na ocenie obecności aloprzeciwciał wiążących dopełniacz w surowicy biorcy z panelem limfocytów pochodzących od 30 niespokrewnionych dawców krwi (indeks PRA – *panel reactive antibodies*) i ustaleniu odsetka reakcji dodatnich. Test powtarzany jest u zakwalifikowanego do przeszczepienia biorcy nerki co 12 tygodni w celu obserwowania tendencji. Jeśli wynik ostatniego testu PRA-CDC jest >80%,

przeszczep u pacjenta jest traktowany jako obligatoryjny, po spełnieniu warunku ujemnej (-) próby krzyżowej. PRA-CDC nie różnicuje ani swoistości ani klasy przeciwciał anty-HLA. Ma ograniczoną wartość, gdyż wykrywa tylko przeciwciała w wysokim mianie, których ilość jest wystarczająca do wywołania u biorcy ostrego AMR już w pierwszej dobie po przeszczepie. Stąd, PRA-CDC jest bezużyteczne w monitorowaniu odpowiedzi humoralnej po przeszczepie. W klasycznej, stosowanej rutynowo postaci PRA-CDC istnieje również odsetek wyników fałszywie dodatnich powodowanych przeciwciałami IgM. Wynik testu PRA-CDC jest ściśle uzależniony od dostępnego fenotypu HLA panelu limfocytów, stąd pojedynczy wynik PRA=0% nie wyklucza obecności aloprzeciwciał wiążących dopełniacz, nawet w wysokim mianie względem innych dawców. Badania biegłości prowadzone przez Eurotransplant wykazały, że rozpiętość wyników testu PRA-CDC może wynosić od 10 nawet do 90%. Niedostateczna czułość metody serologicznej PRA-CDC, brak możliwości różnicowania ich klasy i swoistości to również przyczyny przyjęcia zachowawczej zasady unikania powtórzonych niezgodności HLA przy kolejnych przeszczepach. W razie braku przeciwciał o swoistości DSA u takiego biorcy, zasada ta może być mocno krzywdząca: przykładowo biorca, który w przeszłości otrzymał nerkę od dawcy z antygenami HLA-A1,B8,DR7 a sam takich antygenów nie posiada, zgłoszony po raz kolejny na listę oczekujących nie będzie badany wobec dawców z tymi antygenami. Przy takim układzie antygenów vPRA wynosi 47,13% i w tylu właśnie przypadkach biorca nie będzie brany pod uwagę jako potencjalny biorca przy doborze.

Próba krzyżowa (XM: *cross match*) jak i ocena immunizacji wykonywana jest w oparciu o ocenę serologiczną (CDC). Próba krzyżowa (CDC-XM), przeprowadzana jest bezpośrednio przed transplantacją z limfocytami izolowanymi z węzłów chłonnych lub śledziony zmarłego dawcy. Jest ona jednak znacznie czulsza od testu PRA-CDC. Stosowane są bowiem wydłużone czasy inkubacji oraz, jak zaznaczono powyżej inne źródło limfocytów. Limfocyty izolowane z węzłów chłonnych, zawierają znacznie więcej (około 30%) limfocytów B. We krwi obwodowej jest ich trzykrotnie mniej. Limfocyty B zwiększają czułość wykrywania przeciwciał, ponieważ w stosunku do limfocytów T mają wyższą ekspresję antygenów HLA klasy I (A, B, Cw) oraz wykazują ekspresję HLA klasy II (DR, DQ, DP). W niektórych ośrodkach (również w Gdańsku), próbę krzyżową wykonuje się z dodatkowo zagęszczoną pulą limfocytów B, gdzie ich odsetek sięga 90%, nie ma jednak jednoznacznych krajowych wytycznych z tego zakresu. Wadą CDC-XM populacji limfocytów B może być odsetek reakcji fałszywie pozytywnych z uwagi na dużą gęstość receptorów Fc na tych komórkach. Rozwiązaniem tego problemu może być zalecana obecnie łączna interpretacja wyniku próby krzyżowej z wynikami oznaczenia swoistości przeciwciał metodą LSA (Luminex Single Antigen). Jeśli CDC-XM z komórkami B jest pozytywny, ale nie wykrywa się przeciwciał

metodą LSA, wynik próby krzyżowej można uznać za fałszywie pozytywny. Rekomendacje takiej interpretacji adresowane są głównie jednak do wyników próby krzyżowej wykonywanych techniką fluorymetrii przepływowej.

W większości ośrodków zagranicznych są też ścisłe wytyczne odnośnie archiwizowania surowicy biorców zimmunizowanych, tak aby w czasie próby krzyżowej była ona dostępna w badaniu (tzw. peak PRA serum). Próbę krzyżową dla biorców zimmunizowanych wykonuje się z obiema surowicami – bieżącą oraz z maksymalną wartością PRA. W razie pozytywnego wyniku w którejkolwiek z surowic do transplantacji nie dopuszcza się. Postępowanie takie pośrednio umożliwia określenie obecności komórek pamięci, których obecność jest dla przeszczepu zbyt dużym ryzykiem. W Polsce tych wytycznych się nie stosuje.

Szeroko stosowany w krajach zachodnich jest też wariant AHG CDC-XM. Polega on na wzmocnieniu reakcji poprzez dodanie globuliny antyludzkiej (AHG: anti-human globulin). AHG łączy się z każdym przeciwciałem DSA zwiększając liczbę dostępnych fragmentów Fc immunoglobulin, dzięki czemu zwiększa się ilość miejsc dostępnych dla inicjacji działania dopełniacza.

W przypadku przeszczepów od żywych dawców nie ma możliwości pobierania węzłów chłonnych i decyzja o transplantacji nie powinna opierać się o test CM-CDC. W takich sytuacjach wykonuje się próbę krzyżową metodą cytometrii przepływowej (**FCXM**: flow cytometry cross-match) z limfocytami T oraz B. FCXM wykrywa znacznie niższe miana aloprzeciwciał w porównaniu do klasycznej, serologicznej próby krzyżowej (CM-CDC). Negatywny wynik FCXM ogranicza wystąpienie wczesnego odrzucania zależnego od przeciwciał, jednak kosztem zwiększonego odsetka wyników fałszywie pozytywnych (IgG_4 niewiążące i słabo wiążące dopełniacz IgG3 oraz problem wysokiej wartości tła FCXM limfocytów B). Szacuje się, pozytywny wynik FCXM występuje u około 13% biorców przeszczepianych CDC-XM negatywnych. FCXM wymaga też znacznie mniejszej liczby komórek od CDC-XM, dlatego już z pojedynczej próbki krwi możliwe jest wykonanie FCXM osobno z populacją limfocytów T oraz B. Wydaje się, że rutynowe wykonanie FCXM niezależnie od serologicznej próby krzyżowej, przyniosłoby istotne korzyści w postaci informacji o zwiększonym zagrożeniu wystąpieniem AMR. W grupie pacjentów z (+) FCXM dochodzi dwukrotnie częściej do odrzucania naczyniowego, a roczne przeżycie przeszczepu jest o 10% niższe. Zaznaczony jest też wpływ na późną funkcję przeszczepu: biorcy T-FCXM pozytywni mają odpowiednio o 5,2 i 7,8% krótsze przeżycie przeszczepu na przestrzeni 1 i 5 lat. Szczególnie wysoce narażeni na wystąpienie ostrego AMR są biorcy jednocześnie FCXM i DSA pozytywni. Ryzyko wynosi w takich przypadkach 62% w porównaniu do grupy kontrolnej.

1.3. Inne metody oceny stopnia immunizacji potencjalnych biorców

Pomimo powszechnie stosowanej wspólnej nazwy dla oceny immunizacji, za skrótem PRA kryją się różne metody o zupełnie innej czułości i właściwościach. W Polsce PRA oznacza wykorzystanie wcześniej opisanej metody serologicznej (CDC). W krajach Eurotransplantu (ET), Wielkiej Brytanii czy w USA (UNOS), stosuje się testy fazy stałej (SPA - solid phase assay) z wykorzystaniem fluorymetru przepływowego (Luminex), cytometru przepływowego czy techniki ELISA z identyfikacją rodzaju przeciwciał anty-HLA oraz rozróżnieniem ich klasy. Najpowszechniej do identyfikacji przeciwciał używany jest Luminex. W metodzie wykorzystuje się polistyrenowe, fluorescencyjne mikrokulki pokryte oczyszczonymi antygenami HLA klasy I lub II. Indywidualna fluorescencja mikrokulek, którą wzbudza światło czerwonego lasera umożliwia zróżnicowanie rodzaju antygenu HLA pokrywającego mikrokulkę. W jednej próbce można równocześnie badać do 100 różnych swoistości przeciwciał. Po związaniu przez mikrokulkę przeciwciała anty-HLA z badanej surowicy, dodawane jest anty-ludzkie przeciwciało IgG sprzężone z barwnikiem fluorescencyjnym – fikoerytryną. W ten sposób znakowane są mikrokulki, które związały przeciwciało z badanej surowicy o określonej swoistości i klasie. Jeśli przeciwciało z surowicy zostanie związane, kompleks taki zostanie wzbudzony światłem drugiego – zielonego lasera. Odpowiednie oprogramowanie przetwarza dane z detektorów fluorescencji i wynik reakcji przedstawia w postaci średniej fluorescencji MFI (mean fluorescent intensity) każdej mikrokulki opłaszczonej danym antygenem. Wartość MFI jest proporcjonalna do zawartości przeciwciała anty-HLA w badanej surowicy. W zależności od rodzaju testu, mikrokulki pokryte są jednym antygenem (testy typu Single Antigen) lub sześcioma antygenami (testy typu screening i PRA), co przekłada się na rozdzielczość testu. W pierwszej kolejności wykonywany jest **screening anty-HLA IgG**, który daje odpowiedź czy są obecne przeciwciała anty – HLA i w której klasie (I i /lub II) oraz czy są obecne przeciwciała endotelialne anty-MICA. Przeciwciała anty-MICA są nieobecne na limfocytach, stąd ich obecność nie jest wykrywana w żadnej stosowanej powszechnie próbie krzyżowej. Są jednak drugim po przeciwciałach anty-HLA czynnikiem ryzyka odrzucania humoralnego. Testy typu screening cechuje najniższa rozdzielczość. Ich zaletą jest wysoka czułość i niski koszt. W razie pozytywnego wyniku zalecane jest wykonanie testu typu **Luminex-PRA** w odpowiedniej klasie. Tu każda mikrokulka opłaszczona jest sześcioma antygenami z danej klasy. Osobno dostępne są testy oceniające anty-HLA w klasie I (locus A, B, Cw) oraz w klasie II (locus DR, DQ, DP). Częstość populacyjna występowania poszczególnych fenotypów HLA w przybliżeniu pokrywa się ze sposobem opłaszczenia mikrokulek, symuluje więc potencjalnych dawców. Na tej podstawie wyliczamy jest procent PRA jako

odsetek mikrokulek określonych jako pozytywne. Test wykazuje pośrednią rozdzielczość, nie można na jego podstawie określić kompletu „bezpiecznych" dla biorcy antygenów, tzw. akceptowalnych niezgodności, ponieważ duża część z nich jest maskowana. Test Luminex-PRA służy do wyodrębnienia grupy wysoko zimmunizowanych biorców (PRA > 85%), u których należy wykonać test typu **Single Antigen** o najwyższej rozdzielczości. Każda ze stu mikrosfer opłaszczona jest tutaj tylko jednym antygenem, przez co można opisać wszystkie istotne swoistości anty-HLA z danej klasy. Metoda „Single Antigen" znajduje główne zastosowanie w określaniu akceptowalnych niezgodności w programach dla wysoko zimmunizowanych oraz w monitorowaniu poziomu przeciwciał DSA-specyficznych po przeszczepie. Oznaczenie swoistości anty-HLA pozwala na dalsze działania polegające na wprowadzeniu konkretnych swoistości anty-HLA w zakresie HLA-A, B, (Cw), DR, (DQ), (DP) do ogólnodostępnego programu: **calculated PRA** (**cPRA**) w USA (listy UNOS) lub **virtual PRA** (**vPRA**) w Eurotransplancie (opisany poniżej). Wynik PRA kalkulowany jest w odniesieniu do częstości populacyjnej wprowadzonych swoistości anty-HLA. Częstość antygenów HLA określona jest na dużych grupach np. vPRA bazuje na 4000 dawców oznaczonych w krajach Eurotransplantu. Poznanie konkretnych swoistości anty HLA pozwala również na precyzyjne znalezienie dawcy dla wysoko zimmunizowanego biorcy. Dla przykładu wysoko zimmunizowany biorca z wynikiem cPRA lub vPRA >80%, ale bez obecnych DSA wobec konkretnego dawcy ma zapewniony przeszczep obligatoryjny. Duże zaufanie dla testów oceniających swoistość przeciwciał anty-HLA uzasadniają wyniki badań: W 14 ośrodkach transplantacyjnych na grupie 6620 biorców analizowano poprawność ustaleń nieakceptowanych niezgodności metodą ELISA oraz Luminex Single Antigen w odniesieniu do wyniku próby krzyżowej metodą cytometrii przepływowej (FCXM: flow cytometry cross match). Nieakceptowane niezgodności ustalone metodą fluorymetrii przepływowej (Luminex Single Antigen) poprawnie przewidywały wynik FCXM aż w 93,5% dla limfocytów T oraz w 97,8% dla limfocytów B. Pośrednią w stosunku do CDC czułość wykazuje identyfikacja aloprzeciwciał metodą ELISA, gdzie wynik FCXM był zgodny w 86,1% dla limfocytów T oraz w 91% dla limfocytów B. Na tej podstawie przyjęto w rutynowym stosowaniu tzw. **virtual cross-match**, czyli dobór nerki dla pacjenta zimmunizowanego (cPRA>80%) na podstawie braku przeciwciał anty-HLA przeciwko zgłoszonemu dawcy (UNOS). W mniej radykalnym wariancie, dopuszcza się virtual cross match tylko względem biorców nigdy niezimmunizowanych, określonych na podstawie wysokoczułych testów fluorymetrycznych (surowica bieżąca i historyczne). Postepowanie jest prowadzone celem redukcji czasu zimnego niedokrwienia (Wielka Brytania, wytyczne z 2010r). Oprócz dokładnej charakterystyki wytwarzanych przez biorcę przeciwciał, kluczem dla powodzenia aplikacji virtual cross-match jest rozszerzenie zakresu doboru

tkankowego o locus HLA-C, DQ i względnie DP. Obecnie dobór w Polsce jest prowadzony w zakresie HLA-A, B, DR. Dla przykładu aplikacja virtual cross-match w USA prowadzona w ramach programu przeszczepień od żywych dawców poprawnie przewidywała wynik próby krzyżowej (FCXM) tylko w 43% w 2009 roku. Pod koniec 2010 roku zwiększyła się do 91% dzięki rozszerzeniu zakresu typowania dawcy i biorcy o locus HLA-Cw, DQ, DP oraz ujednoliceniu zasad określania nieakceptowanych niezgodności w cPRA.

1.4. Programy dla zimmunizowanych biorców

W dobie możliwości określania swoistości przeciwciał, a od niedawna też ich lityczności, możliwe stało się precyzyjne różnicowanie, które z przeciwciał anty-HLA mogą być szkodliwe dla biorcy. Na tej podstawie powstało wiele programów dla wysokozimmunizowanych biorców takich jak algorytm Uniwersytetu Emory w ramach list UNOS, USA, Program Akceptowalnych Niezgodności w ramach Eurotransplantu (ET-AMP) z późniejszą modyfikacją o charakterystykę immunogennych epitopów antygenów HLA dla biorcy z użyciem oprogramowania HLAMatchmaker®, oraz wytyczne dla detekcji i charakteryzacji klinicznie istotnych przeciwciał w alotransplantacjach w ramach Brytyjskiego Towarzystwa Transplantacyjnego i Immunogenetycznego (BTS i BSHI). Jak wcześniej opisano, do przeszczepienia wysoko zimmunizowanego biorcy w ramach programu dochodzi tylko w przypadku znalezienia dawcy, wobec którego biorca nie wytworzył przeciwciał. Przeszczep taki odbywa się w trybie obligatoryjnym. Programy bezpiecznego przeszczepiania zimmunizowanych są stale doskonalone i różnią się w poszczególnych krajach. Wpływa na to obszar geograficzny, który obejmuje dany program, zagęszczenie ludności jak i udział przeszczepów od żywych dawców. Wspólnym mianownikiem tych programów jest przeżycie przeszczepu u wysoko zimmunizowanego biorcy bez przeciwciał DSA porównywalne z przeżyciem przeszczepu u niezimmunizowanych, możliwość stosowania odpowiedniego (niekoniecznie bardzo silnego) protokołu immunosupresji i wbrew obawom zwiększony dostęp do przeszczepu dla biorcy zimmunizowanego [9,7,8].

2. CELE PRACY

Przedmiotem pracy było opracowanie algorytmu oceny aloprzeciwciał anty-HLA u biorców przeszczepu nerki, możliwego do wdrożenia w zasięgu krajowym.

Celem realizacji przedmiotu pracy:

- Zweryfikowano liczebność polskich biorców podwyższonego ryzyka immunologicznego, za pomocą wysokoczułej metody fluorymetrii przepływowej.

- Zweryfikowano zasadę wykluczania retransplantowanych biorców z powtórzoną niezgodnością HLA wobec potencjalnego dawcy.

- Dla zimmunizowanych biorców oznaczono dodatkowe, nieimmunogenne niezgodności HLA przy użyciu oprogramowania HLAMatchmaker®.

- Opracowano i wdrożono zmodyfikowaną wersję cytometrycznej próby krzyżowej umożliwiającą ocenę lityczności przeciwciał wiązanych przez komórki dawcy.

- Zaproponowano algorytm oceny biorców oczekujących na przeszczep nerki przy użyciu zastosowanych metod badawczych.

3. NAJWAŻNIEJSZE SPOSTRZEŻENIA Z PREZENTOWANYCH DONIESIEŃ

3.1. Różnice w liczebności biorców podwyższonego ryzyka immunologicznego.

Znacząca różnica w liczbie immunizowanych oczekujących na przeszczep jest wynikiem stosowania odmiennych metod służących tej ocenie. W prezentowanych badaniach przedstawiono skalę tych różnic, która była podstawą dla opracowania algorytmu oceny immunizacji biorców zaakceptowanego przez Ministerstwo Zdrowia [12].

W pierwszym opracowaniu [8] badanym materiałem była surowica 55 biorców nerki zakwalifikowanych do przeszczepienia, u których ostatni wynik PRA oznaczony metodą serologiczną (CDC) przekraczał 50%. Byli to wszyscy biorcy spośród oczekujących z wynikiem PRA-CDC > 50% na Krajowej Liście Oczekujących (KLO) w obecnym czasie. Biorców podzielono na dwie grupy w zależności od wyniku PRA-CDC: 50-79% (n=36) oraz 80-100% (n=19). Algorytm oceny immunizacji uwzględniał oznaczenie aloprzeciwciał metodą fluorymetrii przepływowej (LS - Luminex 200 z oprogramowaniem HLA Fusion®) testem przesiewowym wykrywającym obecność i klasę przeciwciał anty-HLA (LABScreen®Mixed, One Lambda, USA) a następnie zgodnie z wynikiem testu przesiewowego, oznaczenie swoistości przeciwciał w odpowiedniej klasie (LABScreen® Single Antigen, One Lambda, USA). Kalkulację wyniku prowadzono w oprogramowaniu HLA Fusion® według formuły BASELINE. Wartość odcięcia dla wartości pozytywnych ustalono na poziomie 1000 MFI. Zakres 1000-3000 MFI przyjęto jako niski poziom przeciwciał HLA, poziom >3000 MFI jako wysoki. Wyniki oznaczonych swoistości anty-HLA w zakresie loci HLA-A, B, DR (zakres typowania dawcy) zostały wprowadzone do programu virtual PRA dostępnego na stronie www.etrl.org (Eurotransplant Reference Laboratory). Otrzymane wyniki virtual PRA porównano z rutynowo stosowaną metodą PRA-CDC. Wszyscy biorcy posiadali przeciwciała HLA klasy I, a 94,5% klasy II, niewykrywalne w PRA-CDC. Ważną informacją była również ocena częstości występowania przeciwciał przeciw antygenom uznawanym za słabo immunogenne i rutynowo nie oznaczane przy doborze dawca-biorca: HLA -Cw, -DQ, -DP. Wykazaliśmy, że 77% biorców posiadało przeciwciała przeciw HLA-Cw, 84% przeciw HLA-DQ oraz 51% przeciw HLA-DP, w tym 1 osoba (1,8%) posiadała jedynie przeciwciała HLA klasy II o swoistości anty-DP i -DQ. Porównując poziom immunizacji otrzymany metodą PRA-CDC i virtual PRA (Europa), można zauważyć głębokie niedoszacowanie liczby zimmunizowanych w Polsce. Już w samej grupie PRA-CDC 50-79%, gdzie średnia wartość wynosiła 62%+/-10, wynik virtual PRA wyniósł 96% +/- 10, pomimo, że do kalkulacji vPRA brano

pod uwagę tylko immunizację antygenami HLA-A, B, DR (tab. 1), a nie tak jak w większości innych krajów pełen zakres oznaczonych swoistości anty-HLA (locus -A,-B,-Cw,-DR,-DQ). Oznacza to, że pula badanych biorców, według kryteriów ośrodków posługujących się vPRA zaliczałaby się do grupy PRA >95%.

Tabela 1. Porównanie wyników PRA-CDC oraz virtual PRA szacowanego na podstawie wyniku LSA (Luminex Single Antigen).

	[średnie +/- SD] PRA-CDC	[średnie +/- SD] Virtual PRA
PRA-CDC **50-79%**	62,2 +/- 9,5	95,7 +/- 9,9
PRA-CDC **80-100%**	89,5 +/- 8,3	97,2 +/- 4,7

Już na tak wstępnym etapie badań, ekstrapolując wyniki do liczebności chorych można było przypuszczać, że przy zastosowaniu oznaczania swoistości przeciwciał, liczebność wysokozimmunizowanych (vPRA>80%) w Polsce przekraczałaby 200 chorych.

Hipoteza ta została w pełni potwierdzona kolejnymi badaniami w grupie wszystkich potencjalnych biorców zgłoszonych do KLO (tab. 2) [5]. Oznacza to duże zapotrzebowanie na zmiany w rutynowej diagnostyce oceniającej biorców podwyższonego ryzyka immunologicznego w Polsce. Tym cenniejsze wydają się być wyniki badań uzyskanych w pracy dotyczącej algorytmu zimmunizowanych, ponieważ po raz pierwszy wykazały głębokie niedoszacowanie grupy pacjentów immunizowanych w Polsce i potrzebę stosowania innych metod badawczych.

Badanie populacji zakwalifikowanych do przeszczepienia nerek objęło 1460 chorych zgłoszonych do Krajowej Listy Oczekujących w Ustawowych Rejestrach Transplantacyjnych POLTRANSPLANT we wrześniu 2012 roku. Wśród badanych do pierwszej transplantacji zgłoszonych było 1225 chorych, do retransplantacji 235 chorych.

Algorytm oceny immunizacji pozostał niezmieniony i uwzględniał test przesiewowy (LABScreen ® Mixed, One Lambda, USA) oraz oznaczanie

swoistości przeciwciał metodą fluorymetrii przepływowej z zastosowaniem zasady multipleksu (LABScreen ® Single Antigen, One Lambda, USA).

Tabela 2. Aspekt stosowanej metody oceny immunizacji: PRA-CDC vs. cPRA (UNOS)

Biorcy	1) Polska PRA-CDC	2) UNOS CPRA (Luminex)	3) Polska (Luminex screen)
Oczekujący / [%] zimmunizowanych	1460 / 17%	~ 80 000 /66%	1460/50% zimmunizowanych anty-HLA klasa I i/lub II
PRA > 80%	1,31%	15,8%	
PRA > 95%	0,48%	10%	

Źródło:
1) POLTRANSPLANT: statystyki dzienne KLO: liczebności biorców PRA > 80% oraz PRA > 95%
2) Cecka J.M. et.al. Calculated PRA: initial results show benefits for sensitized patients and a reduction in positive crossmatches. Am J Transplant. 2011,11,4,719-724.
3) Moszkowska G., Zielińska H., Zieliński M., Dukat-Mazurek A., Dębska-Ślizień A., Rutkowski B., Lewandowska D., Danielewicz R., Trzonkowski P.: Identification of patients with increased immunological risk among potential kidney recipients in the Polish population. Hum Immunol. 2014, 75, 7, 650-655.

.

Wśród 1460 zgłoszonych do transplantacji nerek, u 50% biorców wykazano przeciwciała IgG anty HLA (tab. 3). Test PRA-CDC wykonany w tym samym czasie wykazał prawie trzykrotnie mniej chorych zimmunizowanych. Dodatni wynik uzyskano tylko u 17% chorych, chociaż ci sami chorzy w przeszłości (maksymalne PRA) mieli potwierdzoną obecność przeciwciał w 35%. Wynik ten jednak wciąż silnie zaniża liczbę uczulonych. Kiedy porównanie dotyczy biorców zgłoszonych do 1-szej transplantacji, różnica w odsetku zimmunizowanych jest jeszcze większa i wynosi 41% vs. 10% na korzyść metod Luminex. Biorąc pod uwagę maksymalne PRA-CDC, wykrywano 41% vs. 28% uczulonych. Największe różnice wykazano wśród zgłoszonych do retransplantacji, gdzie aż 96% potencjalnych biorców oceniono jako uczulonych w teście przesiewowym w stosunku do 52% dodatnich w ostatnim PRA-CDC i 72% w maksymalnym PRA-CDC. Różnica jest statystycznie znamienna ($p<0,05$).

Tabela 3. Liczebność biorców zimmunizowanych oczekujących na transplantację: Luminex screen vs. PRA-CDC

Grupa badana	Liczba chorych	Dodatni wynik		
		Luminex screen / Liczba chorych (%)	PRA CDC bieżący / Liczba chorych (%)	PRA CDC max / Liczba chorych (%)
Zgłoszeni do przeszczepu	1460	726 (50%)	244 (17%)	514 (35%)
Chorzy do 1. transplantacji	1225	501 (41%)	122 (10%)	346 (28%)
Chorzy do retransplantacji	235	225 (96%)	122 (52%)	168 (72%)

Oprócz wyższej czułości, test przesiewowy Luminex umożliwia różnicowanie klasy przeciwciał anty-HLA oraz wykrywa przeciwciała anty-MICA (tab. 4). Biorców uczulonych wobec anty-HLA klasy II jest aż 1/3, anty-MICA 13%. Metoda PRA-CDC nie daje takich możliwości. W oparciu o wyniki otrzymane metodą Luminex lepiej widoczny jest też uczulający wpływ poprzednich transplantacji. Ta stale rosnąca grupa biorców jest najsilniej narażona na odrzucanie. Wysokoczułe testy Luminex z możliwością różnicowania swoistości wykrytych przeciwciał anty HLA dają pacjentom zgłoszonym do retransplantacji szansę na uniknięcie komplikacji związanych z zależnym od przeciwciał odrzucaniem.

Tabela 4. Klasa aloprzeciwciał wykrytych w teście Luminex screen.

Grupa badana	Przeciwciała anty-HLA [wynik dodatni /%]		Przeciwciała anty-MICA [wynik dodatni /%]		
	klasa I	klasa II	Anty MICA[+]	Anty-HLA[+] Anty-MICA[+]	Anty-HLA [-] Anty-MICA [+]
Łącznie	639 (44%)	484 (33%)	195 (13%)	135/195 (69%)	60/195 (31%)
Chorzy do 1. transplantacji	432 (35%)	290 (24%)	134 (11%)	75/134 (56%)	59/134 (44%)
Chorzy do retransplantacji	207 (89%)	194 (83%)	61 (26%)	60/61 (98%)	1/61 (2%)

3.2. Zasada wykluczania retransplantowanych biorców z powtórzoną niezgodnością HLA wobec potencjalnego dawcy

Obecnie, dla pacjentów zgłoszonych do retransplantacji, czynnikiem dyskwalifikującym jest powtórzona niezgodność HLA z dawcą (HLA-MM: *mismatch*), niezależnie od przyczyny utraty nerki powiązanej z ryzykiem immunizacji (powodem może być nawrót choroby lub komplikacje chirurgiczne). Przykładowo biorca, który w przeszłości otrzymał nerkę od dawcy z tylko jednym niezgodnym antygenem HLA-A2, zgłoszony po raz kolejny na listę oczekujących nie będzie badany wobec dawców z tym antygenem. Dla biorcy bez przeciwciał anty-HLA-A2 oznacza to 20% mniejsze szanse na przeszczep (częstość HLA-A2 w europejskiej populacji). Założenie to nie jest ujęte w zasadach alokacji, ale w praktyce biorca nie pojawi się na liście potencjalnych biorców do testu cross-match, jeśli u badanego dawcy występuje HLA-MM. Założenie, że każda niezgodność HLA jest przyczyną immunizacji nie jest zasadne, a wynika z niedostatecznej czułości stosowanej metody PRA-CDC, która wymusza stosowanie tej reguły. W badaniach prowadzonych przez nasz ośrodek nawet w grupie zimmunizowanych biorców (PRA-CDC>50%) oczekujących na kolejny przeszczep, 8,1% pacjentów nie było uczulonych (ujemny wynik testu przesiewowego Luminex). Ponadto, tylko wobec 68,13% wszystkich poprzednich niezgodności wykazano obecność przeciwciał anty-dawca u biorców zgłoszonych do retransplantacji [8].

W kolejnym kroku dokonano analizy stopnia zimmunizowania 235 biorców zgłoszonych do retransplantacji [5]. Chorzy retransplantowani to w ogromnej większości (96%) osoby zimmunizowane. Z każdą kolejną transplantacją odsetek immunizowanych rośnie. Jednak biorąc pod uwagę immunizację poszczególnymi niezgodnościami HLA, wyniki nie są tak jednoznaczne (tab. 5). Nawet biorca zimmunizowany wobec poprzedniego dawcy rzadko posiada przeciwciała przeciwko wszystkim jego niezgodnościom HLA. Informacja o niezgodnościach wobec których nie posiada on przeciwciał pozwoliłaby zwiększyć jego szanse na kolejną transplantacje.

Tabela 5. Obecność przeciwciał przeciw poszczególnym niezgodnościom HLA u biorców zgłoszonych do retransplantacji u 235 biorców zgłoszonych do retransplantacji.

Immunizacja biorców wobec locus:	DSA obecne wobec [%] antygenów HLA	**Brak DSA wobec:**
HLA-A	81 %	**69 MM**
HLA-B	89 %	**96 MM**
HLA-DR	74 %	**99 MM**

Dopuszczenie do przeszczepu biorcy z powtórzoną niezgodnością wobec dawcy niesie duże ryzyko i oprócz analizy obecności DSA metodą LSA powinno uwzględniać, czy dany biorca przeszedł graftektomię niewydolnego przeszczepu. Obrazują to wyniki przeszczepienia prezentowane w opisie przypadku odrzucania zależnego od przeciwciał [6], gdzie dopiero w surowicy pobranej 24 dni po graftektomii w wysokim stężeniu pojawiają się swoistości przeciwciał DSA wcześniej niewykrywalne. Może to oznaczać, że brak obecności przeciwciał DSA wobec niewydolnego przeszczepu u biorcy retransplantowanego jest skutkiem wysycenia przeszczepionej nerki tymi przeciwciałami. W surowicy takich biorców po przeszczepie częściej wykrywa się *de-novo* przeciwciała anty-HLA o swoistości zbliżonej wobec niezgodnych antygenów HLA, jednak nie-DSA. Podobieństwo takie można uwidocznić poprzez analizę immunogenności niezgodnych epitopów antygenowych w programie HLAMatchmaker, które również zaprezentowano w przytoczonej pracy. Tezę absorpcji przeciwciał DSA na niewydolnym przeszczepie potwierdzają też wyniki badań Duquesnoy i wsp. gdzie wykrywalność testami LSA przeciwciał DSA wynosiła odpowiednio dla HLA-MM (locus A, B) 64% vs. 87% (przed i po graftektomii) oraz 57 vs. 86 % dla MM HLA-DR. Być może jest to tylko potencjalne ograniczenie dla testów LSA w wykrywaniu przeciwciał u pacjentów, ale pod uwagę należy wziąć również fakt, że sam zabieg usunięcia nerki sprzyja uwolnieniu antygenów HLA i immunizacji pacjenta w warunkach odstawienia immunosupresji.

3.3. Dodatkowe, nieimmunogenne niezgodności HLA u zimmunizowanych biorców oznaczone przy użyciu oprogramowania HLAMatchmaker®

HLAMatchmaker® jest oprogramowaniem autorstwa Duquesnoy'a służącym ocenie immunogenności antygenów HLA dawcy wobec biorcy. Wykorzystywany jest w krajach Eurotransplantu w programie AMP (Acceptable Mismatch Programme) bezpiecznego przeszczepiania biorców wysokozimmunizowanych. Algorytm zastosowany w oprogramowaniu HLAMatchmaker® opiera się o zasadę, że nie cały antygen ale epitop czyli krótki fragment białkowy jest immunogenny i indukuje produkcję przeciwciał. Epitopy te (tzw. eplety) są powtarzalne w zakresie HLA, a poszczególne antygeny stanowią ich kombinację. Tym samym możliwość oraz stopień rozpoznania niezgodnego antygenu HLA jest ściśle uzależniony od kompletu antygenów HLA biorcy. Oznacza to, że dana niezgodność HLA (mismatch) dla jednego biorcy może być silnie immunogenna, podczas gdy u drugiego biorcy jest zupełnie niegroźna. Co więcej, gdy immunogenne epitopy prezentowane na niezgodnym antygenie dawcy są obecne również u biorcy, wytworzone aloprzeciwciała wiązałyby własne antygeny HLA biorcy. Stąd każda

niezgodność HLA powinna być indywidualnie rozpatrywana w poszczególnej parze. W naszej pracy [8] poświęconej wysokozimmunizowanym biorcom oprogramowanie po uprzedniej rejestracji uzyskano ze stron http://www.hlamatchmaker.net/. Dla HLA klasy I korzystano z wersji ABC Eplet Matching Macro v2.1q, dla HLA klasy II z wersji DR DQ DP Eplet Matching v2.1. Brano pod uwagę allele najczęściej występujące w populacji europejskiej, ponieważ immunogenność może być porównywana tylko na poziomie alleli czyli wysokiej rozdzielczości (układ 4-cyfrowy) z uwagi na konieczność analizy konformacji białkowej do oceny niezgodnych epletów (mmEp). Tylko na podstawie znajomości genotypu HLA-A, B, DR wysokozimmunizowanych biorców (n=55) badanych w naszej pracy określono dodatkowe, nieimmunogenne dla nich (0 mmEp: mismatch eplets) niezgodności HLA. W sumie: 152 dodatkowe antygeny z zakresu HLA locus A, 259 antygenów HLA-B oraz 98 antygenów HLA-DR. Średnio, dla każdego biorcy oznaczały one dodatkowe 2,7; 4,7 i 1,8 akceptowalnych niezgodności odpowiednio z zakresu locus HLA-A, B oraz DR. Stopień immunogenności pary dawca – biorca dobrze koreluje też z wynikiem próby krzyżowej metodą FCXM, na co również wskazują nasze ostatnie wyniki badań. Wśród 32 zimmunizowanych biorców przeszczepu nerki obserwowano silną zależność pomiędzy liczbą niezgodności mmEp a wynikiem próby krzyżowej. Wpływ powtórzonej niezgodności HLA był w przypadku naszej grupy znacznie słabszy [11]. Należy podkreślić, że naszym celem było zaznaczenie potrzeby indywidualnego rozpatrywania niezgodności HLA, szczególnie w przypadku biorców zimmunizowanych. Dla wykorzystania programu HLAMatchmaker w praktyce klinicznej potrzebna jest znajomość pełnego genotypu biorcy (w programie AMP Eurotransplantu biorcy są dodatkowo dobierani w zakresie HLA-Cw, DQ, względnie DP). W przypadku znajomości pełnego genotypu uzyskuje się proporcjonalnie więcej antygenów, które są dla biorcy nieimmunogenne. W razie pojawienia się takiej niezgodności u potencjalnego dawcy, antygen taki nie jest traktowany jako niezgodność. Zastosowanie programu HLAMatchmaker rzuca też nowe światło na produkowane po przeszczepieniu *de novo* przeciwciała anty-HLA. Biorąc pod uwagę, że DSA mogą adsorbować się na przeszczepie, potwierdzenie ich obecności w surowicy może być utrudnione. Wtedy na swoistą odpowiedź humoralną mogą pośrednio wskazywać przeciwciała anty-HLA, nie DSA produkowane *de novo.* Pod kątem specyficzności tych przeciwciał, są one skierowane przeciw podobnym strukturalnie antygenom HLA o zbliżonym ładunku immunogenności wyrażanym ilością takich samych epletów. Zaprezentowany opis przypadku odrzucania zależnego od przeciwciał jest przykładem takiej zależności [6]. Wyniki oceny immunogenności przedstawionej pary dawca – biorca wskazują, że niezgodne antygeny, szczególnie HLA-A3 i HLA-B44 są silnie immunogenne dla biorcy (tab. 6A). Ponadto, wytwarzane przez biorcę de novo przeciwciała rozpoznawały wiele epitopów wspólnych między niezgodnymi

antygenami (tab. 6B). Specyfika odpowiedzi humoralnej biorcy, powoduje, że właściwe monitorowanie po przeszczepie nie powinno ograniczać się do badania obecności DSA tylko w razie podejrzenia odrzucania humoralnego. Zasadnym jest cykliczne monitorowanie tej odpowiedzi z informacją o zmianach w poziomie i specyficzności obecnych przeciwciał anty-HLA.

Tabela 6. Analiza przeciwciał produkowanych *de novo* przez biorcę ze stwierdzonym odrzucaniem humoralnym po przeszczepie. Wyniki analizy HLAMatchmaker® w zakresie:

A. **Immunogenności HLA niezgodnych dla biorcy antygenów.**

B. **Wytwarzanych przez biorcę przeciwciał**. Zaznaczono wspólne epitopy dla niezgodnych antygenów HLA z dawcą oraz epitopy antygenów HLA, przeciwko którym biorca wytworzył przeciwciała.

A. Analiza immunogenności HLA badanej pary dawca-biorca przy użyciu oprogramowania HLAMatchmaker. Czerwonym kolorem zaznaczono niezgodne dla biorcy epitopy HLA dawcy oraz niezgodności HLA.

HLA Biorcy	**HLA Dawcy**	**„Ładunek" immunogenności: Liczba niezgodnych epeletów [mmEp]**	**Immunogenne dla biorcy epitopy dawcy (Ep: eplet)**
A*2402	**A*0301**	8	9F,161D, 62QE ,70AQS, 73TD, 76VGT ,113YR, 275EL
A*2601	**A*2902**	4	9T, 62LQ ,70AQS,**113YR**
B*3801	**B*4402**	10	**11AMR**, 199V, **41T**, 44RKE, **62RE**, **76ERT**, **94I** ,113YD, **163L**,166ES,
B*1801	X	-	-
DRB1*0701	DRB1*0701	-	-
DRB1*0101	X	-	-

* analiza HLAMatchmaker opiera się o wysoką rozdzielczość typowania HLA, która uwzględnia 3-rzedową strukturę białka. Do celów oceny posłużono się częstościami alleli najczęściej występującymi w populacji europejskiej.

B. Najsilniej reagujące przeciwciała anty-HLA u biorcy w 130 dobie po przeszczepie (według wyników testu Luminex Single Antigen)

Swoistość Anty-HLA	**Nasilenie przeciwciał (MFI)**	**Liczba niezgodnych epitopów (mmEp)**	**Immunogenne epitopy (eplet) (czerwono zaznaczone epitopy obecne u dawcy)**
B62 (B*1501)	16055	5	11AMR,44RMA,62RE,151RE,163L
A11 (A*1101)	16012	7	62QE,70AQS,73TD,76VGT,113YR, 151HA,275EL
B13 (B*1302)	15945	8	**11AMR**,**41T**,44RMA,**62RE**,**76ERT**, 116L,144TQL,**163L**
A36 (A*3601)	15218	8	**9F**,44KME,62QE,**113YR**,149AVH,1 51HA,158V,275EL
A1 (A*0101)	14387	8	**9F**,44KME,62QE,90D,**113YR**,149A VH,151HA,158V
B49 (B*4901)	13668	8	**11AMR**,**41T**,44RKE,**62RE**,113YN,1 16L,151RE, 163L

3.4. Zmodyfikowana wersja cytometrycznej próby krzyżowej z oceną lityczności przeciwciał wiązanych przez komórki dawcy

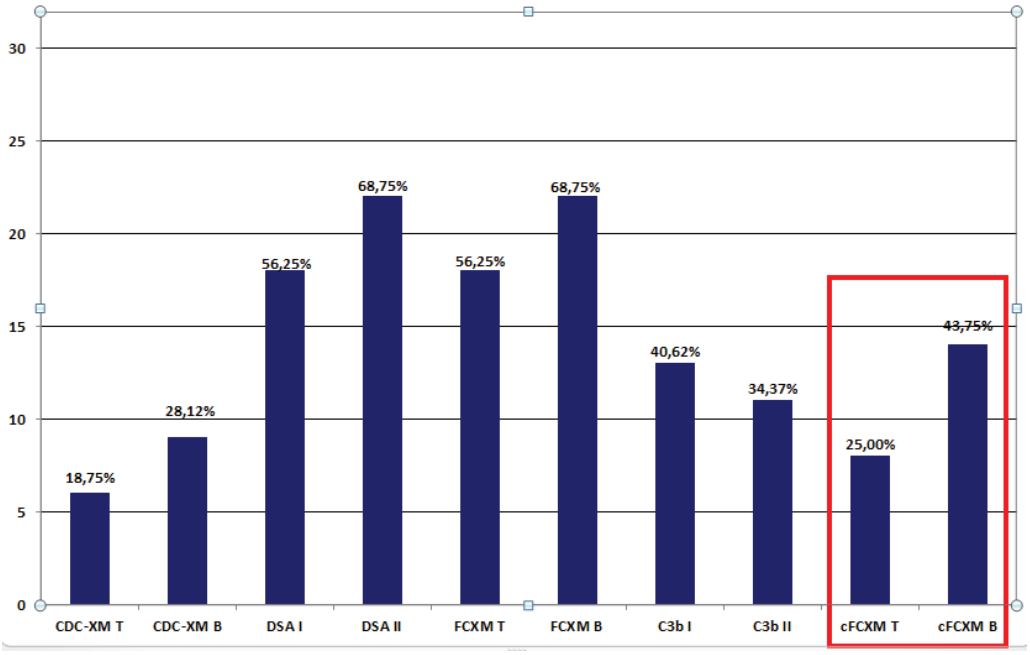
Podstawowe problemy w interpretacji FCXM wynikają z braku informacji o litycznośći (i klinicznej istotności) wykrytych IgG oraz wysokiego tła charakterystycznego dla próby krzyżowej z limfocytami B. Brak informacji o litycznośći wiązanych przeciwciał przekłada się na zwiększoną ilość fałszywie dodatnich, nieistotnych klinicznie, wyników. Wysokie tło w zakresie oceny B-FCXM związane jest z ekspresją powierzchniowych immunoglobulin (FcR) na limfocytach B. Szacuje się, że nawet połowa dodatnich B-FCXM przy ujemnym wyniku T-FCXM może być powodowana wiązaniem FcR. Litycznośćć przeciwciał anty-HLA może być obecnie różnicowana w zmodyfikowanych testach LSA wykrywających tylko przeciwciała aktywujące dopełniacz (LSA-C1q /LSA-C3b). Rozwiązanie takie również ma wady - bazuje na rekombinowanych cząsteczkach HLA sprzężonych z nośnikiem, co może być związane z marginesem wyników fałszywie dodatnich. Rozwiązaniem najbliższym reakcji *in vivo* w przedprzeszczepowej ocenie ryzyka immunologicznego byłby test bazujący na komórkach dawcy o czułości pośredniej pomiędzy FCXM a CDC-XM, dobrze korelujący z litycznymi anty-HLA. W założeniu kryteria takie powinna spełniać FCXM zmodyfikowany poprzez zastosowanie barwnika żywotności komórek, po uprzedniej inkubacji surowicy biorcy i komórek dawcy z dopełniaczem.

W opisanej przez nas metodzie (cFCXM – cytolytic Flow Cytometry Cross Match) [10] zastosowaliśmy barwnik 7AAD (7 aminoaktynomycyna D), wnikający do wnętrze martwych komórek odpowiednio CD3+ (cFCXM-T) oraz CD19+ (cFCXM-B). Dodatkową modyfikacją było zastosowanie króliczej frakcji immunoglobulin do eliminacji wpływu tła FcR – pochodnego w zastępstwie do trawienia pronazą. Obecnie istnieje tylko kilka prac z tego zakresu, nasze opracowanie jako pierwsze szeroko porównuje nowo opisaną metodę cFCXM z pozostałymi służącymi ocenie DSA.

Opisany przez nas protokół cFCXM przeprowadzono w grupie 32 pacjentów, dla których zastosowano dwa kryteria wyboru: byli to biorcy zimmunizowani, zgłoszeni do retransplantacji. Dwadzieścia dziewięć (29) osób oczekiwało na drugą, trzech pacjentów na trzecią transplantację. Obecność przeciwciał anty-HLA u biorców potwierdzono w teście przesiewowym Luminex (GenProbe). Poziom immunizacji był również określony metodą PRA-CDC, dla którego wartość mediany wynosiła 34%. Dodatkowo, połowa badanych biorców miała niezgodność HLA wobec dawcy. Stopień niezgodności HLA przedstawiał się następująco: w klasie I HLA: 3,29+/-1,5 HLA-MM, w klasie II wartość średnia wraz z odchyleniem standardowym wyniosła 0,9+/- 0,7 niezgodności HLA. Limfocyty izolowane ze śledziony pozyskano od trzech

zmarłych dawców, wobec których wykonano próbę krzyżową opisanym 32 potencjalnym biorcom. Limfocyty ze śledziony uzyskano metodą homogenizacji i izolacji w gradiencie gęstości (Gradisol L, AquaMed, Polska). Surowicę negatywną stanowił materiał pozyskany od 15 zdrowych mężczyzn z grupą krwi AB, w którym uzyskano ujemny wynik testu przesiewowego (LIFECODES LifeScreen Deluxe Kit (Gen-Probe, USA). Przeprowadzono próbę krzyżową w czterech wariantach: klasycznym (CDC-CM), cytometrycznym (FCXM), metodą fluorymetrii przepływowej (DSA-XM; Luminex, GenProbe) oraz badanym cFCXM. Dodatkowo wykonano ocenę lityczności przeciwciał anty-HLA wykrytych w teście przesiewowym (LS-C3b, GenProbe).

Rycina 1. Odsetek dodatnich wyników CM w grupie 32 zimmunizowanych biorców. Zaznaczono wyniki cFCXM.



W grupie 32 badanych biorców, 6 osób (18,75%) miało przeciwciała wykrywane w CDC–XM z limfocytami T, a 9 osób (28,12%) z limfocytami B. Wynik FCXM z limfocytami T był dodatni u 18 (56,25%), a z limfocytami B u 22 osób (68,75%). Identyczne wyniki uzyskano w przypadku DSA-XM. Ocena wiązania dopełniacza wykonana metodą Luminex screen C3b dała dodatni wynik dla klasy I u 13 osób (40,62%), a klasy II u 11 osób (34,37%). Wynik zmodyfikowanej metody cFCXM z limfocytami T był dodatni u 8 osób (25%), a z limfocytami B u 14 osób (43,75%) . Pozytywny wynik cFCXM był we

wszystkich przypadkach potwierdzony dodatnim wynikiem DSA-XM. Podobnie, wszystkie dodatnie wyniki cFCXM korespondowały z potwierdzoną obecnością przeciwciał litycznych ocenionych metodą Luminex - C3b screening (Ryc. 1).

Wyniki naszych badań potwierdziły większą wykrywalność przeciwciał DSA w FCXM, wśród których można założyć część wyników fałszywie dodatnich (przeciwciała nielityczne). Dodatnich wyników FCXM jest trzykrotnie więcej z limfocytami T i 2,4 krotnie więcej dla limfocytów B aniżeli w teście CDC-XM. Modyfikacja cFCXM zmniejsza liczbę dodatnich wyników w porównaniu z klasycznym FCXM. W przypadku limfocytów T ponad dwukrotnie (z 18 do 8 pozytywnych wyników) dla limfocytów B, 1,5 krotnie (z 22 do 14 pozytywnych wyników). Otrzymane wyniki pozwalają postawić hipotezę o przydatności zmodyfikowanej próby krzyżowej metodą cytometrii przepływowej (cFCXM) jako potencjalnej metody identyfikującej ważne klinicznie, lityczne przeciwciała anty–HLA. Porównując wyniki otrzymane metodą klasycznej próby krzyżowej (CDC–XM), metodami fluorymetrii przepływowej (DSA-XM, C3b Screening HLA) oraz metodą zmodyfikowaną (cFCXM) wydaje się, że w przypadku cFCXM poziom wykrywanych przeciwciał jest najlepszy, bo adekwatny do zamierzonego zastosowania. Czułość metody cFCXM można przedstawić w formie: FCXM, DSA-XM < **cFCXM** < CDC-XM. Jak wcześniej podano, wszystkie dodatnie wyniki cFCXM zostały potwierdzone wynikiem DSA-XM (Genprobe). Jednak nie wszystkie pozytywne wyniki DSA-XM zostały potwierdzone w cFCXM, co jest związane z faktem wykrywania jedynie litycznych przeciwciał wobec komórek dawcy. Ciekawie wypada porównanie metody C3b z cFCXM. Zwiększony odsetek dodatnich wyników C3b względem cFCXM ma swoją przyczynę w technice wykonania oznaczenia C3b, polegającej na połączeniu metody przesiewowej (Luminex screen, GenProbe) z przeciwciałem anty-C3b. Test przesiewowy wykrywa przeciwciała anty–HLA DSA i nie-DSA. Stąd różnice w otrzymywanych wynikach oznaczeń. Rzeczywiste porównanie mogłoby dostarczyć zestawienie LSA-C3b z cFCXM. Niestety w czasie przeprowadzania naszych badań ocena liryczności w testach LSA nie była jeszcze dostępna.

Podsumowując należy stwierdzić, że dalsze badania nad użytecznością metody cFCXM wydają się być zasadne. Szczególnie ważne byłoby porównanie wszystkich różnic metodycznych pojawiających się pomiędzy pracami poszczególnych autorów oraz korelacja wyników cFCXM z częstością incydentów ostrego AMR.

3.5. Propozycja algorytmu oceny immunologicznej biorców oczekujących na przeszczepienie nerki

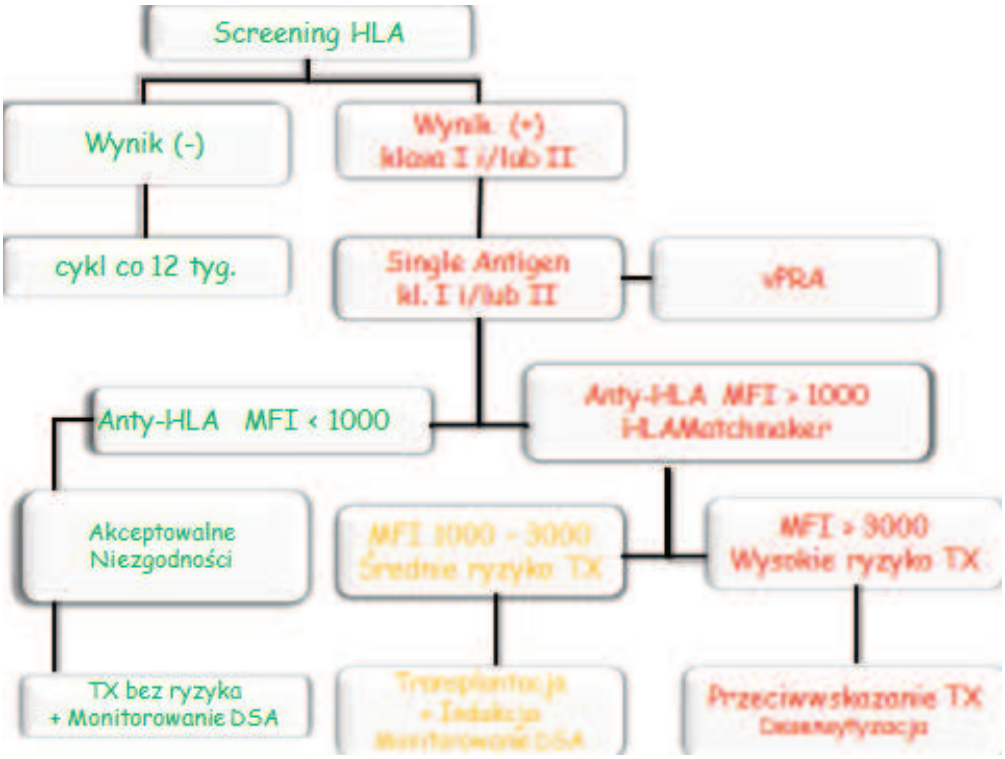
Dzięki zmianie systemu alokacji przeprowadzonej w Polsce pod koniec 2009 roku, istotnie zwiększył się dostęp do transplantacji dla potencjalnych biorców zimmunizowanych powyżej 50% PRA-CDC (z 15 w 2009r do ponad 40 przeszczepionych w kolejnych latach). Jednak brak standardów diagnostycznych umożliwiających identyfikację i monitorowanie produkcji przeciwciał *de novo* uniemożliwia ocenę skali ryzyka takiej transplantacji dla wysokozimmunizowanego biorcy. Pomiar poziomu immunizacji serologiczną metodą cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (PRA-CDC) istotnie zaniża liczbę zimmunizowanych. W naszych pierwszych badaniach z tego zakresu, wyniki oceny 55 biorców z PRA-CDC>50% pokazały, że według standardów światowych (vPRA) są to biorcy wysokozimmunizowani, vPRA > 95% [8]. Kolejne badania przeprowadzone na całej populacji chorych z listy KLO potwierdziły nasze wstępne założenia [5]. Kolejnym problemem jest dostęp do transplantacji rosnącej grupy biorców zgłoszonych do retransplantacji. Według obecnych zasad nie mogą oni być przeszczepieni z powtórzoną niezgodnością HLA. Jednak, zgodnie z naszymi wynikami, 5% z nich w ogólne nie posiada przeciwciał anty-HLA (przyczyną utraty przeszczepu może być nawrót choroby lub powikłanie chirurgiczne). Znacznie częściej, wśród swoistości anty-HLA brak jest przeciwciał przeciw wybranym niezgodnościom, co szczegółowo przedstawiono w części poświęconej retransplantowanym biorcom. Istotnym w doborze do przeszczepu biorców retransplantowanych jest też informacja, czy pacjent miał wykonaną graftektomię, co wpływa na wykrywalność DSA po przeszczepie.

W naszym opracowaniu z 2011r zaproponowano algorytm oceny immunizacji (ryc. 2) uwzględniający identyfikację rodzaju przeciwciał u wszystkich biorców [8]. W pierwszym etapie wysokoczułe testy fazy stałej (Luminex) pozwoliłyby podzielić oczekujących na przeszczepienie na dwie grupy: niezimmunizowanych (standardowe ryzyko immunologiczne) oraz zimmunizowanych (podwyższone ryzyko immunologiczne). Grupa druga w następnym etapie wymaga identyfikacji swoistości przeciwciał anty-HLA. Oznaczone swoistości anty-HLA w zakresie HLA-A, B, DR wprowadzane byłyby następnie do programu virtual PRA, umożliwiającego określenie poziomu immunizacji vPRA. Postępowanie takie zapewniłoby odpowiednią czułość badań ze znajomością realnego poziomu immunizacji, umożliwiałoby standaryzację badań i zapobiegałoby wahaniom PRA-CDC uzależnionym od panelu limfocytów. Wśród pozostałych korzyści należy wymienić:

- Ocena vPRA zwiększa dostęp do bezpiecznego przeszczepu (dodatkowe punkty za PRA dla biorców obecnie kwalifikowanych jako niskozimmunizowanych)

- Ustalenie akceptowalnych niezgodności HLA dla każdego biorcy, niezależnie od poziomu immunizacji
- Zwiększenie szansy na przeszczep dla biorców zgłoszonych do retransplantacji: możliwość bezpiecznego przeszczepienia z powtórzoną niezgodnością w razie braku przeciwciał DSA przeciwko poprzedniej niezgodności HLA. Założenie można przyjąć na podstawie wyników przeszczepiania biorców PRA(+)DSA(-) nie różniących się od wyników w grupie niezimmunizowanych.

Rycina 2 Proponowany algorytm oceny immunizacji biorców zgłoszonych do przeszczepu nerkowego.



Wymierne korzyści z aplikacji algorytmu to możliwość podejmowania decyzji o przeszczepie w oparciu o badania - realna znajomość czynników ryzyka i adekwatne do jego poziomu leczenie ograniczające odrzucanie ostre i wydłużające przeżycie przeszczepu. Algorytm pozwala na identyfikację grupy

wysoko zimmunizowanych klasyfikowanych w rutynowym teście PRA-CDC jako słabo/ nie zimmunizowani. Dla tej grupy możliwy jest pozbawiony ryzyka odrzucania dobór oparty o akceptowalne niezgodności ze standardowym protokołem immunosupresji, tym samym ograniczona zmniejszoną toksycznością leków. Dla wysokozimmunizowanych, (vPRA>85%) algorytm daje szanse na znajomość skali ryzyka przeszczepu, możliwość dostosowania do niego protokołu leczenia w oparciu o monitorowanie odpowiedzi po przeszczepie.

Rozwój diagnostyki transplantacyjnej nasuwa już teraz pewne modyfikacje wobec zaproponowanego w 2011 roku algorytmu. Istotą przeciwciał anty-HLA wpływających na powodzenie przeszczepu jest ich zdolność do aktywacji dopełniacza. Obecnie jest już możliwość połączenia testów typu „single antygen" (LSA) z oceną ich lityczności poprzez drugorzędowe przeciwciało anty-C3b lub anty-C4d [1]. Ocenę należy przeprowadzić w drugiej kolejności, po identyfikacji swoistości przeciwciał. Aspekt kosztowy sprawia, że postępowanie byłoby zarezerwowane dla biorców wysokiego ryzyka (vPRA>80%), z najmniejszą szansą na znalezienie właściwego dawcy. Kolejną kwestią jest zakres typowania HLA do przeszczepu. W krajach Eurotransplantu [13], UNOS [14] i w Wielkiej Brytanii [15] dobór obejmuje w większości również HLA-Cw oraz HLA-DQ. Oprócz korzyści z lepszej alokacji, dla biorców vPRA >85% oznacza to także więcej akceptowalnych, bezpiecznych niezgodności HLA ustalonych przy pomocy programu HLAMatchmaker®. Umożliwi to aplikację wirtualnej próby krzyżowej, która potwierdza swoją użyteczność w przypadku dużych populacji (ET, UNOS, WB)

Ostatni etap doboru – próba krzyżowa jest badaniem kluczowym z uwagi na dwa aspekty. Zapewnia 100% swoistość bazując na komórkach rzeczywistego dawcy oraz stanowi realny punkt odniesienia dla ustalenia skali ryzyka transplantacji. Opisana przez nas próba krzyżowa z oceną lityczności związanych przeciwciał (cFCXM) wydaje się obiecującym rozwiązaniem w tym zakresie. Pośrednia między CDC-XM a klasyczną FCXM czułość metody jest największą jej zaletą.

Odrębnym problemem jest diagnostyka potranspalantacyjna, określająca swoistą odpowiedź biorcy na antygeny konkretnego przeszczepu. Silną zależność pomiędzy obecnością DSA a gorszym rokowaniem dla przeżycia przeszczepu potwierdzają liczne doniesienia, co przekłada się na wytyczne z tego zakresu w najnowszych, wieloośrodkowych wytycznych [4]. Coraz więcej doniesień sugeruje, że to właśnie AMR jest główną przyczyną przewlekłej niewydolności aloprzeszczepu, a nie uszkodzenie toksyczne, jak sądzono wcześniej [2]. Pomimo postępu w leczeniu immunosupresyjnym, przeżycie przeszczepu w dłuższym okresie utrzymuje się wciąż na względnie stałym, niezadowalającym poziomie: 10-letnie GS w USA dla przeszczepów od żywych i zmarłych dawców wynosi odpowiednio 40,8% i 57,9% [3].

Monitorowanie DSA po przeszczepie może pomóc wcześniej wykryć zmiany związane z AMR umożliwiając odpowiednio szybszą interwencję. Punktem wyjścia dla monitorowania DSA jest szczegółowa znajomość swoistości przeciwciał przed przeszczepem, co umożliwia określenie ryzyka takiej transplantacji i wdrożenie odpowiednich środków zapobiegawczych. Podstawową korzyścią z rutynowego monitorowania DSA po przeszczepie byłaby odpowiednio wczesna wykrywalność procesu odrzucania zarówno we wczesnym etapie (subkliniczne, tlące się AMR) jak i późnym (IF/TA – włóknienie śródmiąższowe z zanikiem cewek, wcześniej CAN). Prócz tego, w przypadkach dobrze odpowiadających na leczenie, brak przeciwciał DSA mógłby być podstawą dla zmniejszenia dawki leków immunosupresyjnych ograniczając efekty toksyczne. Tym samym, zastosowanie monitorowania DSA dobrze wpisuje się w ideę „terapii szytej na miarę". W Polsce badania DSA wykonywane są w nielicznych ośrodkach i tylko w wyjątkowych przypadkach.

4. WYKAZ CYTOWANEGO PIŚMIENNICTWA

1. Loupy A., Lefaucheur C., Vernerey D., Prugger C., Duong van Huyen J.P., Mooney N., Suberbielle C., Frémeaux-Bacchi V., Méjean A., Desgrandchamps F., Anglicheau D., Nochy D., Charron D., Empana J.P., Delahousse M., Legendre C., Glotz D., Hill G.S., Zeevi A., Jouven X.: Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. N. Engl. J Med. 2013, 369, 13, 1215-1226

2. Nankivell B.J., Alexander S. I.: Rejection of the kidney allograft. N. Engl. J. Med. 2010, 363,15,1451-1462.

3. Sutherland S.M., Chen G., Sequeira F.A., Lou C.D., Alexander S.R., Tyan D.B.: Complement-fixing donor-specific antibodies identified by a novel C1q assay are associated with allograft loss. Pediatr. Transplant. 2012, 16,1,12-7.

4. Tait B.D., Süsal C., Gebel H.M., Nickerson P.W., Zachary A.A., Claas F.H., Reed E.F., Bray R.A., Campbell P., Chapman J.R., Coates P.T., Colvin R.B., Cozzi E., Doxiadis I.I., Fuggle S.V., Gill J., Glotz D., Lachmann N., Mohanakumar T., Suciu-Foca N., Sumitran-Holgersson S., Tanabe K., Taylor C.J., Tyan D.B., Webster A., Zeevi A., Opelz G.: Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. Transplantation 2013,95,1,19-47.

5. Moszkowska G., Zielińska H., Zieliński M., Dukat-Mazurek A., Dębska-Ślizień A., Rutkowski B., Lewandowska D., Danielewicz R., Trzonkowski P.: Identification of patients with increased immunological risk among potential kidney recipients in the Polish population. Hum. Immunol. 2014, 75, 7, 650-655.

6. Zielińska H., Jankowska M., Zieliński M., Moszkowska G., Dębska-Ślizień A., Rutkowski B., Trzonkowski P.: Zależne od przeciwciał odrzucanie aloprzeszczepu nerkowego - opis przypadku. Forum Nefrologiczne 2011, 4, 4, 347–355

7. Zielińska H., Moszkowska G., Dębska-Ślizień A., Zieliński M., Jankowska M., Rutkowski B., Trzonkowski P.: Możliwości diagnostyczne oceny ryzyka immunologicznego biorcy nerki przed przeszczepieniem i po jego wykonaniu. Forum Nefrologiczne 2011, 4, 4, 320–330

8. Zielińska H., Moszkowska G., Zieliński M., Dębska-Ślizień A., Rutkowski B., Trzonkowski P.: Algorithm to Manage Highly Sensitized Kidney Transplant Recipients in Poland. Transplant. Proc. 2011, 43, 8, 2903-2907

9. Zielińska H., Zieliński M., Moszkowska G., Dębska-Ślizień A., Jankowska M., Rutkowski B., Trzonkowski P.: Znaczenie diagnostyczne swoistych

aloprzeciwciał anty-HLA u chorych przed i po transplantacji nerek. Programy dla wysokozimmunizowanych. Postepy Hig. Med. Dosw. 2009; 63, 435-448

10. Zieliński M., Zielińska H., Moszkowska G., Dębska-Ślizień A., Rutkowski B., Trzonkowski P.: Modified flow cytometry crossmatch detecting alloantibody-related cytotoxicity as a way to distinguish lytic antibodies from harmless in allosensitised kidney recipients. Transplant. Proc. 2013, 45,1, 88-94.

11. Zielińska H., Zieliński M., Moszkowska G., Dębska-Ślizień A., Rutkowski B., Trzonkowski P.. Is the exclusion of kidney recipient for pretransplant matching with repeated HLA mismatch donor always correct? Cent. Eur. J. Immunol. 2014, 39, suppl. 1, s. 56

Źródła internetowe:

12. Wyniki konkursu ofert MZ w zakresie Programu identyfikacji pacjentów podwyższonego ryzyka immunologicznego
http://www2.mz.gov.pl/wwwmz/index?mr=m1&ms=234&ml=pl&mi=234&mx=0&mt=&my=281&ma=030565

13. Polityka alokacji wysokozimmunizowanych w krajach Eurotransplantu – program AMP

http://etrl.eurotransplant.org/cms/index.php?page=amprogram

14. Polityka alokacji nerek w USA
http://optn.transplant.hrsa.gov/ContentDocuments/OPTN_Policies.pdf#nameddest=Policy_04

15. Polityka alokacji wysokozimmunizowanych w Wielkiej Brytanii „Guidelines for the detection and characterisation of clinically relevant antibodies in allotransplantation”

www.bshi.org.uk/PDF/BSHI_BTS_guidelines_2010.pdf

5. STRESZCZENIA PRAC /ABSTRACTS

1. **Hanna Zielińska**, Maciej Zieliński, Grażyna Moszkowska, Alicja Dębska-Ślizień, Magdalena Jankowska, Bolesław Rutkowski, Piotr Trzonkowski.: **Znaczenie diagnostyczne swoistych aloprzeciwciał anty-HLA u chorych przed i po transplantacji nerek**. Programy dla wysokozimmunizowanych. Postepy Hig. Med. Dosw. 2009, 63, 435-448

Obecność swoistych aloprzeciwciał anty-HLA u chorego oczekującego na przeszczep nerki jest główną barierą zabiegu transplantacji. Brak odpowiednich dawców dla wysoko zimmunizowanych pacjentów powoduje, że okres oczekiwania na przeszczep jest znacznie dłuższy, co przekłada się na niski odsetek przeszczepów w tej grupie. Przeszczep dla pacjenta zimmunizowanego jest też obarczony większym ryzykiem powikłań. Aby zwiększyć dostęp tym pacjentom do transplantacji powstało wiele programów. Postęp w zakresie możliwości określania HLA-akceptowalnych niezgodności umożliwił znaczny rozwój programów dla nich, z których już wdrożone (ET-AMP, UNOS, algorytm Emory) przynoszą bardzo dobre rezultaty zarówno w aspekcie zwiększenia dostępu do przeszczepu jak i jego przeżycia. Odrębny problem stanowi humoralny aspekt procesu odrzucania. Wykazano silny związek pomiędzy odrzucaniem a obecnością aloprzeciwciał – zarówno w okresie okołoprzeszczepowym, jak i długo po przeszczepie (CAN, chronic allograft nephropathy). Stąd wydaje się, że niewystarczające jest ograniczenie badań diagnostycznych z zakresu wykrywania aloprzeciwciał anty-HLA jedynie do okresu przedtransplantacyjnego, jak to się dzieje obecnie. Monitorowanie aloprzeciwciał może stanowić doskonały wskaźnik prognostyczny dla funkcjonowania przeszczepu, a narastanie miana może wyprzedzać inne objawy umożliwiając szybką interwencję.

Diagnostic value of specific anty-HLA alloantibodies before and after renal transplantation. Programs for highly sensitized.

Anti-HLA alloantibodies are the main barrier in kidney transplantation. Lack of appropriate donors for highly sensitized (HS) recipients makes the access to transplantation highly difficult and results in a significant increase in both the time on waiting list and the number of post-transplant complications in these patients. The transplantation itself is also associated with higher risk in HS. There are many programs aimed to increase the access to renal transplantation for this group of recipients. It has to be highlighted that new acceptable HLA-mismatches made significant progress in programs for HS. Currently implemented programs (ET-AMP, UNOS, Emory algorithm) proved to be useful as they increased the access to transplantation and graft survival in HS. Nevertheless, even with these programs, there is still the problem of humoral rejection in these patients. A strong correlation between donor specific

antibodies (DSA) and graft rejection shown both immediately after transplantation and in long-term complications, like CAN (chronic allograft nephropathy), may be the simplest explanation of this effect. Hence, the assessment of alloantibodies limited to pre-transplant period, which is nowadays routine, seems to be insufficient. Current evidence suggests that early detection of posttransplant DSA may be an excellent prognostic marker of graft function and may allow to implement necessary treatment prior to rejection.

2. **Hanna Zielińska**, Grażyna Moszkowska, Alicja Dębska-Ślizień, Maciej Zieliński, Magdalena Jankowska, Bolesław Rutkowski, Piotr Trzonkowski. **Możliwości diagnostyczne oceny ryzyka immunologicznego biorcy nerki przed przeszczepieniem i po jego wykonaniu**. Forum Nefrologiczne 2011, 4, 4, 320–330

Pomimo ogromnego postępu jaki dokonał się w zakresie stosowanych leków immunosupresyjnych, wciąż jedną z przyczyn utraty nerki jest odrzucanie. Szczególnie zagrożeni tym powikłaniem są biorcy zimmunizowani, którzy w większym stopniu narażeni są na ryzyko odrzucania humoralnego. Ten typ odrzucania może wystąpić zarówno we wczesnym okresie po transplantacji jak i być przyczyną utraty nerki z przyczyn immunologicznych w późniejszym okresie. Przekłada się to na znacznie gorsze wyniki transplantacji w tej grupie chorych. Rozwiązania nowoczesnej diagnostyki immunologicznej mogą przynieść istotne korzyści zarówno na etapie doboru do przeszczepu jak i monitorowania odpowiedzi po transplantacji. W pracy przedstawiono metody pomiaru i oceny immunizacji w oparciu o identyfikację swoistości aloprzeciwciał anty-HLA i ich wykorzystanie na etapie:

- Poprawy doboru do przeszczepu: przy pomocy obecnych metod możliwe jest określenie u zimmunizowanego biorcy kompletnej grupy „bezpiecznych" antygenów HLA, wobec których nie wykrywa się u niego przeciwciał. Oznaczenie swoistości przeciwciał anty-HLA jest też podstawą dla nowej, czulszej i dokładniejszej metody oceny immunizacji tzw. virtual PRA, czyli określeniu częstości prawdopodobieństwa dodatniej próby krzyżowej wobec reprezentatywnej populacji potencjalnych dawców. Precyzyjna identyfikacja swoistości przeciwciał anty-HLA w połączeniu z rozszerzeniem zakresu typowania antygenów HLA u dawców i biorców umożliwia wprowadzenie tzw. virtual Cross-Match, który jest oparty na najlepszym doborze HLA przy jednoczesnym bezwzględnym unikaniu antygenów HLA dawcy, wobec którego biorca posiada przeciwciała.

- Monitorowania odpowiedzi humoralnej po przeszczepie jako identyfikacja przeciwciał specyficznych dla HLA dawcy, tzw. (DSA - donor specific antibody).

Ocena immunologiczna przed i monitorowanie po przeszczepieniu w oparciu o nowoczesną diagnostykę immunologiczną pozwala na uzyskanie wyników porównywalnych z grupą biorców niezimmunizowanych.

Diagnostic possibilities in the immunological risk assessment among kidney recipients before and after transplantation.

Although enormous progress made in the use immunosuppressive drugs, still rejection is one of the reasons of kidney loss. Especially at risk are highly sensitized recipients, who are greater exposed to the risk of humoral rejection than non-sensitized recipient. This type of rejection can occur in the early as well as in the late period after transplantation and may cause loss of the kidney. This results in significantly worse graft survival in these patients. Modern immunological diagnostic solutions can bring significant benefits both at the stage of selection for transplantation as well as monitoring the immunological response after transplantation. The study presents methods of measurement and evaluation of immunization based on the identification of the specificity of anti-HLA alloantibodies and their use on the stage:

- Improvement in immunological matching for transplantation: using current methods it is possible to determine complete panel of "safe" HLA antigens for each highly sensitized recipient. Against this HLA antigens recipient should not possess any detectable antibodies. Determination of specificity of anti-HLA antibodies is also the basis for a new, more sensitive and accurate method of assessing immunization in so-called virtual PRA, which determines the frequency of probability a positive cross match against representative population of potential donors. Precise identification of the specificity of anti-HLA antibodies in association with extending the range of HLA typing of donors and recipients allows us to enter so-called virtual Cross-Match, which is based on the best HLA-typing selection and absolute avoiding of donor's HLA antigens against the recipient has antibodies.
- Monitoring humoral immune response after transplantation as the identification of antibodies specific for donor HLA, so called DSA – donor specific antibody.

Immunological evaluation before and monitoring after transplantation on the basis of modern immunological diagnostics allows to obtain results comparable with a group of non-sensitized recipients

3. **Hanna Zielińska**, Grażyna Moszkowska, Maciej Zieliński, Alicja Dębska-Ślizień, Bolesław Rutkowski, Piotr Trzonkowski. **Program przeszczepiania dla wysokozimmunizowanych biorców w Polsce.** Transplant. Proc. 2011, 43,8, 2903-2907.

Cel pracy: Programy transplantacyjne dla zimmunizowanych biorców są kluczowe dla zwiększenia szansy na dobór dawców dla tej grupy chorych i uzyskanie pozytywnych poprzeszczepowych wyników klinicznych. W Polsce do oceny immunizacji stosowana jest metoda cytotoksyczności zależnej od dopełniacza PRA-CDC, według której biorców PRA-CDC > 50% jest około 3,8%. W Stanach Zjednoczonych (lista oczekujących UNOS; United Network for Organ Sharing), biorców takich jest ok. 16%. Niedoszacowanie liczebności zimmunizowanych biorców w Polsce powodowane jest różnicami metodycznymi w ocenie aloprzeciwciał.
Materiał, metody: W pracy zbadano 55 biorców zgłoszonych do przeszczepu z wynikiem PRA-CDC > 50%. Przeprowadzono następujący algorytm oceny immunizacji: test przesiewowy Luminex HLA- screen, oznaczenie swoistości - Luminex Single Antigen, virtual PRA - ocena immunizacji pacjenta oraz analiza akceptowalnych niezgodności HLA (HLAMatchmaker®).
Wyniki: Wszyscy biorcy posiadali przeciwciała HLA klasy I, a 94,5% klasy II. W grupie PRA-CDC 50-79% oraz >80% średnia wartość wynosiła 62,2% i 89,5%. U tych samych biorców otrzymano wyniki virtual PRA odpowiednio 95,7% oraz 97,2%. Ponadto, 77% biorców posiadała przeciwciała antyHLA-Cw, 84% anty-DQ oraz 51% anty-DP. Wśród badanych zimmunizowanych zgłoszonych do retransplantacji, tylko wobec 68% wszystkich MM stwierdzono przeciwciała w badanej grupie. Dla wszystkich badanych biorców oznaczono dodatkowe, akceptowalne niezgodności za pomocą HLAMatchmaker®: 152 swoistości dla locus A i 252 dla locus B.
Wnioski: Ocena immunizacji chorych zakwalifikowanych do transplantacji powinna być standardowo wykonana przy użyciu wysokoczułych testów oceniających klasę, swoistość i poziom aloprzeciwciał, co umożliwi ustalenie bezpiecznych niezgodności z potencjalnym dawcą. Rutynowo stosowany test PRA-CDC istotnie zaniża liczbę chorych wysoko zimmunizowanych. Wykluczenie z listy chorych z powtórzoną niezgodnością jest uproszczeniem, zabierającym wielu biorcom szansę na przeszczep.

Algorithm to Manage Highly Sensitized Kidney Transplant Recipients in Poland.

Objective: Programs for immunized transplant recipients are essential to achieve graft survivals comparable to those of non-immunized recipients. The threshold in Poland is a PRA by the complement-dependent cytotoxicity (CDC) method greater than 50%, which includes approximately 3.8% of the patients. At

the same time the United Network for Organ Sharing there recipients represent approximately 16% of the waiting list in the United Network for Organ Sharing (UNOS). The underestimation of the immunized group in Poland may be due to differences in laboratory techniques to assess alloantibodies.
Materials and methods: This study investigated 55 potential recipients with a PRA by CDC 50%. We used the following algorithm to assess their immunization: Luminex screening test for an HLA antibody; specificity assessed with Luminex Single Antigen, vPRA (evaluation of immunization of the patient); and analysis of acceptable HLA incompatibilities (HLAMatchmaker).
Results: All recipients were positive class I anti-HLA antibodies and 94.5% were positive for class II. For the groups of subjects with PRA-CDC from 50% to 79% versus those greater than 80%, the average values of PRA-CDC were 62.2% and 89.5%, respectively. The virtual PRA results for these groups were 95.7% and 97.2%, respectively. In addition, anti-HLA-Cw, anti-DQ and anti-DP antibodies were detected in 77%, 84%, and 51% of recipients, respectively. Immunized recipients reported to the next transplant were characterized by the antibodies against mismatch only in 68%. For all potential recipients, additional acceptable non-compliance was determined with HLAMatchmaker: 152 specificity for locus A and 252 for locus B.
Conclusions: Evaluation of immunization status of recipient candidates should be routinely performed using tests to assess class and specificity as well as level of alloantibodies to enable determination of a safe potential donor. As a routine test, PRA-CDC underestimates the number of highly immunized patients. Exclusion from the list of patients with repeated non-compliance is a simplification, which reduces their chance for transplantation.

4. **Hanna Zielińska**, Magdalena Jankowska, Maciej Zieliński, Grażyna Moszkowska, Alicja Dębska-Ślizień, , Bolesław Rutkowski, Piotr Trzonkowski. **Zależne od przeciwciał odrzucanie aloprzeszczepu nerkowego — opis przypadku**. Forum Nefrologiczne 2011, 4, 4, 347–355.

Ostre odrzucanie zależne od przeciwciał stanowi jedną z częstszych przyczyn niewydolności bądź skrócenia przeżycia przeszczepu. Problem dotyczy nie tylko pacjentów wysoko zimmunizowanych z wysokim odsetkiem PRA-CDC, ale i szerokiej grupy biorców z niskim stężeniem przeciwciał anty-HLA, niewykrywalnych w rutynowych testach serologicznych. Przeciwciała te, nawet w niskich mianach są pochodną obecności komórek pamięci, które w szybkim czasie poprzez klonalną proliferację mogą doprowadzić do uszkodzenia przeszczepu. Zaprezentowany opis przypadku dotyczy pacjentki średnio zimmunizowanej (PRA=16%), która w ciągu 6 miesięcy od przeszczepu utraciła nerkę w wyniku odrzucania zależnego od przeciwciał, potwierdzonego nowo dostępnymi testami diagnostycznymi typu LSA (Luminex Single Antigen) oraz

DSA-XM (Donor Specific Antibodies Cross-Match) i oceną immunogenności pary dawca-biorca w programie HLAMatchmaker. Możliwość wczesnej diagnostyki z użyciem tych testów może usprawnić postępowanie terapeutyczne i zwiększyć jego skuteczność.

Case report: antibody-dependent rejection in kidney allotransplantation.

Acute humoral rejection is one of the most common causes of failure or shorten the survival of the graft survival. The problem affects not only highly sensitized patients with a high percentage of PRA-CDC, but a wide group of recipients with low levels of anti-HLA antibodies, undetectable by routine serological tests. These antibodies, even at low titers indicate the presence of memory cells, which through clonal proliferation can quickly damage the graft. Presented case report concerns on sensitized patient (PRA = 16%), who within 6 months of transplantation lost a kidney as a result of rejection-dependent antibodies. Type of rejection was confirmed by the newly available diagnostic tests: LSA (Luminex Single Antigen) and DSA-XM (Donor Specific Antibodies Cross-Match). Additionally immunogenicity of donor-recipient pairs was evaluated by the HLAMatchmaker software. Utilization of modern diagnostics with the use of these tests may improve the therapeutic management and increase its effectiveness.

5. Maciej Zieliński, **Hanna Zielińska**, Grażyna Moszkowska, Alicja Dębska-Ślizień, Bolesław Rutkowski, Piotr Trzonkowski. **Zmodyfikowana metoda FCXM wykrywająca limfocytotoksyczność związanych aloprzeciwciał sposobem na rozróżnienie przeciwciał istotnych klinicznie od nieszkodliwych.** Transplant Proc. 2013 Jan-Feb;45(1):88-94.

Obecność aloprzeciwciał anty-dawca weryfikowane jest rutynowo w serologicznej próbie krzyżowej (CDC-CM). Wśród przeszczepionych jest jednak niewielka grupa chorych rozwijających nadostre odrzucanie zależne od przeciwciał, z powodu niedostatecznej czułości serologicznej próby krzyżowej. Z tych samych powodów, nawet u 20% biorców przeszczepu dochodzi do ostrego odrzucania, gdzie zaangażowana jest odpowiedź humoralna lub humoralno-komórkowa. Był to bodziec do rozwoju czulszych technik próby krzyżowej (FCXM), który nie znalazł rutynowego zastosowania z uwagi na odsetek wyników fałszywie dodatnich będących pochodną przeciwciał nieistotnych klinicznie (wiążące, nielityczne). W pracy porównano wyniki oceny aloprzeciwciał metodami klasycznymi (CDC-XM i FCXM) ze zmodyfikowaną wersją cFCXM, pozwalającą określić lityczność wykrytych przeciwciał (cFCXM; cytolytic flow cytometry crossmatch). Obecność przeciwciał anty-HLA potwierdzono metodą fluorymetrii przepływowej (Luminex). Odnosząc wyniki prób krzyżowych do obecności przeciwciał DSA (Luminex), cFCXM

charakteryzuje wyższa czułość od CDC-XM, a jednocześnie cFCXM umożliwia klasyfikację związanych przeciwciał anty-dawca według ich lityczności, co niweluje wpływ dodatnich, nieistotnych klinicznie wyników FCXM.

Modified flow cytometry crossmatch detecting alloantibody-related cytotoxicity as a way to distinguish lytic antibodies from harmless in allosensitised kidney recipients.

The serological complement-dependent cytotoxicity crossmatch (CDC-XM) permits routine identification of anti-donor alloantibodies in the sera of allotransplant recipients. However, in a small group of recipients, antibodies below the threshold of detection may still be responsible for hyperacute rejection. For the same reason, approximately 20% of recipients develop acute rejection episodes. The flow cytometry crossmatch (FCXM) was designed to address these problems, but because of the presence of clinically insignificant antibodies (linked, non-lytic), the FCXM appears to be too sensitive yielding false-positive results. We compared FCXM with its modified version assessing cell viability (cytolytic flow cytometry crossmatch; cFCXM) using sera from previously sensitised kidney recipients. The presence of alloantibodies was detected using the Luminex platform.

The cFCXM proved to be of greater sensitivity than CDC-XM, which was additionally confirmed with bead-based Luminex techniques. The cFCXM was also superior to FCXM because it distinguished lytic from non-lytic antibodies. The cFCXM was superior to assess donor specificity, sensitivity, and detection of clinically relevant lytic antibodies.

6. Grażyna Moszkowska, **Hanna Zielińska**, Maciej Zieliński, Anna Dukat-Mazurek, Alicja Dębska-Ślizień, Bolesław Rutkowski, Dorota Lewandowska. Roman Danielewicz, Piotr Trzonkowski: **Identyfikacja pacjentów podwyższonego ryzyka immunologicznego wśród potencjalnych biorców nerek w polskiej populacji**. Human Immunology 75 (2014) 650–655

Realizacja programu przedprzeszczepowej identyfikacji pacjentów podwyższonego ryzyka immunologicznego możliwa jest dzięki nowym technologiom pozwalającym na wysokoczułe wykrywanie i charakterystykę klinicznie ważnych aloprzeciwciał obecnych u potencjalnych biorców nerek. Testami fazy stałej Luminex Screen przebadano 1460 chorych zgłoszonych na Krajową Listę Oczekujących Poltransplant. Ustalono liczbę pacjentów z przeciwciałami anty HLA, a następnie w grupie 235 immunizowanych, zgłoszonych do re transplantacji testami Luminex Single Antigen określono swoistości antygenowe aloprzeciwciał. Wyniki porównano z danymi dotyczącymi stopnia immunizowania tych chorych ocenianych rutynowym

testem PRA CDC. Badania wykazały znacznie wyższą czułość metody LS, umożliwiającą już przy jednokrotnym badaniu ocenę pacjenta w zakresie jego immunizacji. Wykazano, że określenie w testach LSA swoistości antygenowych przeciwciał anty HLA, pozwala zidentyfikować obecność przeciwciał wobec poprzednich niezgodności (MM) oraz ustalić akceptowalne niezgodności. Wprowadzenie tych badań do rutynowej diagnostyki przedtransplantacyjnej pozwoliłoby na szybszą i dokładniejszą ocenę ryzyka immunologicznego biorcy, dobór właściwego dawcy, ustalenie odpowiedniego schematu leczenia immunosupresyjnego, a wyniki stanowiłyby punkt odniesienia dla poprzeszczepowego monitorowania wytwarzania aloprzeciwciał swoistych dla dawcy.

Identification of patients with increased immunological risk among potential kidney recipients in the Polish population.

Pretransplant identification of allosensitized patients is possible thanks to new technologies, which allow for accurate detection of clinically relevant alloantibodies. Implementation of these methods in the screening of patients awaiting transplantation increased their chance for successful donor-recipient matching.

Here, 1460 patients reported to the Polish National Waiting List were screened with the Luminex Screen (LS) solid phase test for anti-HLA antibodies. The patients with detected anti-HLA antibodies were assayed with the Luminex Single Antigen (LSA) tests in order to establish defined antigen specificity of the alloantibodies. The results were compared with data on the immunization assessed with the routine complement-dependent-cytotoxicity panel-reactive-antibody assay (PRA CDC).

The study showed significantly higher sensitivity of the LS method when compared with PRA CDC. It has been shown that LSA test is a useful technique identifying the specificities of alloantibodies. In particular, LSA allowed to assess donor specific antibodies (DSA) to previous mismatches (MM) and to determine acceptable HLA mismatches of the potential donors.

The introduction of solid phase tests in routine pretransplant diagnostics allowed for faster and more accurate assessment of the immunological risk of the recipients and optimal donor-recipient matching. Hence, presented algorithm of solid phase assays has become a new standard for the identification of allosensitized patients awaiting kidney transplantation in Poland.

PODZIĘKOWANIA

Pragnę podziękować

Pracownikom Katedry i Kliniki Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, GUMed.

- Ordynatorowi Kliniki: Pani Profesor Alicji Dębskiej-Ślizień - za ogromną chęć współpracy, poświęcony czas, życzliwość. Szczególnie zaś za cenne uwagi i dyskusje przy każdej z prezentowanych w niniejszej rozprawie publikacji.
- Kierownikowi Katedry: Panu Profesorowi Bolesławowi Rutkowskiemu za umożliwienie współpracy i okazaną życzliwość
- Dr Magdalenie Jankowskiej za pomoc w ocenie klinicznej pacjentów, współpracę zapewniającą ciągłość wykonywanych badań oraz dyskusje podczas przygotowywania publikacji powstających na podstawie prezentowanych wyników.
- Dr Agnieszce Tarasewicz za pomoc w ocenie klinicznej pacjentów.
- Mgr Beacie Białobrzeskiej za ogromną cierpliwość i poświęcenie przy pobieraniu materiału od pacjentów oraz okazaną życzliwość i pomoc przy pojawiających się problemach.

Panu Profesorowi Zbigniewowi Śledzińskiemu oraz Chirurgom z Kliniki Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej za umożliwienie pobierania materiału do badań.

Koleżankom i Kolegom z Zakładu Immunologii Klinicznej i Transplantologii oraz z Laboratorium Immunologii Klinicznej, Transplantacyjnej i Hematologii za stworzenie przyjaznej atmosfery oraz wszechstronną pomoc w trakcie wykonywania projektu.

Ani Dukat-Mazurek za wielokrotne przejmowanie ciężaru opieki nad Pracownią HLA umożliwiając mi dokończenie niniejszej pracy.